

საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

თეა ნინუა

მცენარეული ინგრედიენტების გამოყენებით ახალი
სასურსათო პროდუქციის შექმნა მათთვის ფუნქციური
დანიშნულების გაუმჯობესების მიზნით

სადოქტორო პროგრამა - ქიმიური და ბიოლოგიური ინჟინერია
შიფრი - 0711

დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად
წარდგენილი დისერტაციის

ავტორ ეფერ ატი

თბილისი
2024 წელი

სამუშაო შესრულებულია შემდეგ დაწესებულებებში

საქართველოს ტექნიკურ უნივერსიტეტი

ქიმიური ტექნოლოგიისა და მეტალურგიის ფაკულტეტი
ქიმიური და ბიოლოგიური ტექნოლოგიების დეპარტამენტი,

აგრარული მეცნიერებები და ბიოსისტემების ინჟინერინგის ფაკულტეტი
სურსათის უვნებლობის ლაბორატორია

საგანმანათლებლო - სამეცნიერო ბიოსამედიცინო კვლევითი
ცენტრი „ბიომედი“

სამეცნიერო ხელმძღვანელები: პროფ. ედიშერ კვესიტაძე
პროფ. თეიმურაზ ბუაჩიძე

რეცენზენტები:

.....

დაცვა შედგება.....წლის ”.....”.....საათზე

საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტის ქიმიური ტექნოლოგიისა და
მეტალურგიის ფაკულტეტის სადისერტაციო ნაშრომის დაცვის კოლეგიის
სხდომაზე,

კორპუსი -----, აუდიტორია -----

მისამართი: 0160, თბილისი, მ. კოსტავას ქ. 69.

დისერტაციის გაცნობა შეიძლება სტუ-ის ბიბლიოთეკაში, ხოლო
ავტორეფერატისა – ფაკულტეტის ვებგვერდზე

ფაკულტეტის სწავლული მდივანი

შესავალი

თემის აქტუალობა: თანამედროვე კვების მრეწველობის ერთ-ერთ აქტუალურ საკითხს წარმოადგენს სპეციალიზებული ფუნქციური საკვები პროდუქტების მიღების ახალი და უფრო სრულყოფილი გზების ძიება, შესაბამისი ტექნოლოგიების შემუშავება, რათა მოახდინონ კონკრეტული დაავადებების პრევენცია და უკეთ მართვა. ცელიაკია არის ქრონიკული მულტიფაქტორული ანთებითი დაავადება, რომელიც ხასიათდება ნაწლავური და არანაწლავური გამოვლინებებით- სისხლის შრატის სპეციფიური ანტისხეულების წარმოქმნითა და აუტოიმუნური პასუხით, წვრილი ნაწლავის ლორწოვანი გარსის დაზიანებებითა და სხვა. იგი უკავშირდება გლუტენის მიღებას, რომელსაც შეიცავს პური და პურპროდუქტები, მკარონისა და საკონდიტრო ნაწარმი, ლუდი, ბურღული (მანანის, შვრიის, კუსკუსი და ა.შ.). გლუტენის კვალს შეიცავს ზოგიერთი საკვები პროდუქტი: ნაყინი, იოგურტი, რძის ფხვნილი, ნაღები, შესქელებული რძე, ყველეული, მაიონეზი, მარგარინი. ხორბლოვნები (ჭვავი, ქერი, ხორბალი) შეიცავენ პროლინითა და გლუტამინით მდიდარ ცილებს- პროლამინებს, რომლის მოხმარებას რიგ ადამიანებში შეუძლია გლუტენდამოკიდებული ისეთი დაავადებების ინიცირება, როგორიცაა ცელიაკია, ალერგია ხორბალზე, ხაბაზის ასთმა, ანაფილაქსია . პროლინი და გლუტამინი განსაზღვრავენ ხორბლოვნების ცილის სტრუქტურას, რომელსაც ადამიანის საჭმლის მომნელებელი ტრაქტის ფერმენტები სრულად ვერ შლიან. არასათანადო ფერმენტაციის შედეგად ჩნდება ე.წ. გლუტენური პეპტიდები, რომლებიც შეიცავენ საკვებთან ერთად მიღებული გლუტენის 10%. დაუშლელი გლუტენური პეპტიდები ხშირად შთაინთქმება წვრილი ნაწლავის ლორწოვანი გარსის მიერ და ცელიაკიით დაავადებულ ადამიანებში ააქტიურებს ნაწლავის იმუნურ უჯრედებს. წვრილი ნაწლავის პათოლოგიური პროცესი იწყება გლუტენის პეპტიდებით ნაწლავის ლორწოვანის დაზიანების შემდეგ, რასაც თან ახლავს ნაწლავის ლორწოვანი გარსის ატროფია და შეწოვის ფუნქციის მოშლა. ასეთი ტიპის აქტივაცია არ შეინიშნება ჯანმრთელ ადამიანებში-ხდება დაუშლელი პეპტიდური ფრაგმენტების ექსკრეცია მაგ. შარდთან ერთად. ამგვარად, პათოგენური მოქმედების თავიდან არიდება შეიძლება, თუ გლუტენს დავშლით ამინომჟავურ

კომპონენტებამდე.

ცელიაკიის მრავალფეროვანი სიმპტომებიდან ყველაზე თვალსაჩინოა საკვების მონელების დარღვევა და იმუნური რეაქციები. ეს დაავადება უმეტესწილად ვლინდება გლუტენზე გენეტიკურად მგრძნობიარე ადამიანებში. ცელიაკია ვლინდება მსოფლიო მოსახლეობის 0.6-დან 1.0 %-ში . უგლუტენო პროდუქტები სპეციალიზირებული საკვები პროდუქტების წარმოება -რეალიზაციის თვალსაზრისით ერთ-ერთ მნიშვნელოვან სეგმენტს წარმოადგენს. ამის დამადასტურებლად კმარა თუნდაც ის ფაქტი,რომ ბოლო 20 წელიწადში მსოფლიოს მასშტაბით უგლუტენო პროდუქციის წარმოება გაზრდილია 125 %-ით.პროგნოზების თანახმად, უგლუტენო პროდუქტების გლობალური ბაზარი 2030 წლისთვის შთამბეჭდავ 15,1 მილიარდ აშშ დოლარს მიაღწევს. ცნობილია, რომ პროტეოლიზური ფერმენტების დახმარებით შესაძლებელია სხვადასხვა ცილოვანი სუბსტრატის დაშლა მცირე ზომის პეპტიდებად და ამინომჟავებად ,რასაც დიდი მნიშვნელობა აქვს სხვადასხვა ბიოტექნოლოგიურ პროცესში. განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია მოძიებულ იქნას ისეთი პროტეაზები,რომლებიც დაშლიან ხორბლოვნების გლუტენურ ფრაქციას მცირე ზომის პეპტიდურ ფრაგმენტებამდე და ამინომჟავებამდე და ამავდროულად შეუნარჩუნებენ ან გაუმჯობესებენ საკვებ პროდუქტს საგემოვნო თვისებებს. კვებითი მრეწველობის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ასპექტს წარმოადგენს პროტეაზების გამოყენება პურფუნთუშეულის წარმოებაში ფქვილში არსებული გლუტენის ჰიდროლიზისა და უგლუტენო პროდუქციის მიღებისათვის, აგრეთვე ცომის მახასიათებლების გაუმჯობესებისათვის (ელასტიურობის გაზრდა,ზელვის დროის შემცირება, მოცულობის გაზრდა და სხვა). ისეთი მცენარეული პროტეაზები,როგორიცაა პაპაინი,კარიკაინი და ბრომელაინი წარმატებით გამოიყენება პურისა და საკონდიტრო ნაწარმის ცხობისას. აქტუალურობას იძენს ის ფაქტი,რომ პროტეაზების წყაროს წარმოადგენდეს იაფი,ფართოდ ხელმისაწვდომი უსაფრთხო ნედლეული,როგორიცაა საკვებად ვარგისი და სამკურნალო მცენარეები.

სამუშაოს მიზანია:

- პროტეოლიზური ფერმენტის მიღება იზაბელას ფოთლებიდან.

- გლუტენის დაშლა პროტეოლიზური ფერმენტული პრეპარატის მეშვეობით, რომელიც მიღებულია იზაბელას ფოთლებიდან.
- უგლუტენო პურის დამზადება, რომელიც მაქსიმალურად მიახლოებული იქნება ტრადიციული გზით მიღებულ პურთან თავისი საგემოვნო მახასიათებლებით

მიზნის განსაზოორციელებლად შესრულებული გარკვეული ამოცანები:

1. იზაბელას ფოთლებიდან ექსტრაქტის მიღება
2. მისი შემოწმება მძიმე მეტალებისა და ზოგიერთი მინერალური ნივთიერების შემცველობაზე
3. პროტეოლიზური ფერმენტული პრეპარატის მიღება .
4. მიღებული პრეპარატის ზოგიერთი ფიზიკო-ქიმიური მახასიათებლის შესწავლა .
5. გლუტენური კომპლექსის მიღება ხორბლის ფქვილიდან
6. გლუტენის დაშლა იზაბელას პროტეაზას გამოყენებით
7. გლუტენის სიღრმისეული დაშლის დადასტურება ელექტროფორეზის გზით
8. პროტეოლიზური რეაქციისათვის ზოგიერთი პარამეტრის დადგენა (დრო, ტემპერატურული რეჟიმი, ფერმენტის რაოდენობის დადგენა (აქტივობის მიხედვით) 1 გრ. გლუტენურ მასაზე გადაანგარიშებით) .
9. ხორბლის უგლუტენო ცომის მიღება პროტეაზის გამოყენებით.
10. ზოგადი ტექნოლოგიური სქემის შემუშავება იზაბელას ფოთლის პროტეაზას გამოყენებით უგლუტენო პურის მიღების მიზნით.

მეცნიერული სიახლე: სადისერტაციო კვლევის ფარგლებში მოხდა იზაბელას ფოთლებში პროტეოლიზური ფერმენტის აღმოჩენა და მისი ზოგიერთი პარამეტრის შესწავლა. იზაბელას პროტეაზას ზემოქმედებით მოხდა ხორბლის ფქვილის გლუტენური ფრაქციის სიღრმისეული დაშლა. დადგენილ იქნა ფერმენტის რაოდენობა (აქტივობის მიხედვით) 1 გ. გლუტენურ მასაზე გადაანგარიშებით.

ჩატარდა სკრინინგი საქართველოს სხვადასხვა რეგიონიდან შეგროვილი სამკურნალო მცენარეებისა და აგრეთვე ვაზის სხვადასხვა ჯიშის (უპირატესად, ენდემური და დაავადებისადმი მდგრადი ჯიშების) მასალაში მაღალი

პროტეაზული აქტივობის მქონე ცილების გამოსავლენად. შეირჩა ერთ-ერთი ყველაზე მაღალაქტიური პროტეაზას მქონე ნედლეული- იზაბელას ფოთოლი. მიღებული პროტეაზა გამოიცადა სხვა პროტეაზებზე ზეგავლენის მოხდენის მიზნით და დადგინდა, რომ იზაბელას ფოთლის პროტეაზას გააჩნია შერჩევითი ინჰიბიტორული და აქტივატორული ზემოქმედება სხვა პროტეაზებზე.

იზაბელას ფოთლის პროტეაზა გამოცდილ იქნა, როგორც ხორბლოვნების ძირითადი ცილოვანი ფრაქციის-გლუტენის დამშლელი ფერმენტი. ექსპერიმენტების შედეგად დადასტურდა იზაბელას ფოთლის პროტეაზას მიერ გლუტენის ჰიდროლიზი ხსნად დაბალმოლეკულურ პეპტიდებად და ამინომჟავებად, რაც მნიშვნელოვანია ცელიაკიური ცილოვანი ბუნების ალერგენების აცილების თვალსაზრისით.

სამუშაოს პრაქტიკული მნიშვნელობა: იზაბელას პროტეაზას ზემოქმედების შედეგად მიღებული უგლუტენო პური მაქსიმალურად მიახლოებულია თავისი საგემოვნო თვისებებით ტრადიციული გზით მიღებულ პურთან. მიღებული შედეგები მნიშვნელოვნად გააფართოვებს მეცნიერების თეორიულ და პრაქტიკულ ცოდნას და მომავალში, დანერგილ იქნება ახალი მეთოდით მიღებული უგლუტენო პური, რომელსაც ექნება გაუმჯობესებული საგემოვნო და რეოლოგიური თვისებები. პერსპექტიულად მიიჩნევა იზაბელას ფოთლის პროტეაზას გამოყენება ისეთი გლუტენშემცველი პროდუქციის წარმოების მიზნით, როგორიცაა ლუდი, ნამცხვრები, მაკარონაწარმი და სხვა. ცელიაკიით დაავადებული ადამიანებისათვის შეთავაზებულ იქნება უგლუტენო პროდუქცია, რომელიც თავისი საგემოვნო და სხვა თვისებებით მაქსიმალურად მიახლოებული იქნება ტრადიციული მეთოდებით დამზადებულ პროდუქციასთან.

კვლევის ობიექტი: კვლევის ობიექტს წარმოადგენს ვაზის ბუნებრივი ჰიბრიდი იზაბელა (*Vitis Labrusca* L.). იგი ფართოდაა გავრცელებული თითქმის მთელ მსოფლიოში, რადგან შეუძლია იხაროს ისეთ ადგილებში, სადაც ვაზის სხვა ჯიშებისათვის პირობები არაა დამაკმაყოფილებელი; გამოირჩევა სიცხისა და სიცივისადმი გამძლეობით, ფილოქსერასა და სოკოვანი დაავადებების მიმართ დიდი მდგრადობით, ამიტომაც არ ითხოვს შეწამვლას. ეს ბუნებრივი ჰიბრიდი ძირითადად გვხვდება მაღლარის ან ველურად ხეზე გასული სახით, აგრეთვე მას

რგავენ ეზოებისა და თალარების გამწვანების მიზნით. ყურძნის ამ ჯიშის ფოთლის გამოყენება მნიშვნელოვან როლს შეასრულებს ეკონომიკაში.

კვლევის მეთოდოლოგიური ეტაპები:

I ეტაპზე ჩატარდა მცენარეთა სკრინინგი მაღალაქტიური პროტეაზული ცილების შემცველობის გამოვლენის მიზნით. ნედლეულის რამოდენიმე ნიმუშს შორის შეირჩა იზაბელას ფოთოლი, რომელიც ფართოდაა ხელმისაწვდომი და ამავედროულად, შეიცავს აქტიურ პროტეოლიზურ ფერმენტს. ნედლეული შემოწმდა მძიმე მეტალების შემცველობაზე.

- მძიმე მეტალების შემცველობის განსაზღვრა მოხდა სპექტროფოტომეტრულად ალურ-აბსორბციული სპექტროფოტომეტრის Buck Model 210VGP გამოყენებით.
- ცილების რაოდენობა განისაზღვრა ლოურისა და ბრედფორდის მეთოდებით ფოტოკოლორიმეტრულად

II ეტაპზე მოხდა ნიმუშებში საერთო პროტეოლიზური აქტივობის დადგენა კოლორიმეტრული მეთოდით. მიღებულ იქნა ფერმენტული პრეპარატი

III ეტაპზე განისაზღვრა:

- იზაბელას პროტეოლიზური ფერმენტული პრეპარატის ზოგიერთი ფიზიკურ-ქიმიური პარამეტრი (ტემპერატურული და pH-ოპტიმუმი, მოლეკულური მასა და სხვა).
- გელ-დიფუზური მეთოდით- ინჰიბიტორული და აქტივატორული თვისებები.

IV ეტაპზე დადგენილ იქნა

- იზაბელას ფოთლის პროტეაზას ზეგავლენა წებოგვარაზე-ამ მიძნით ხორბლის ფქვილიდან მიღებულ იქნა გლუტენური ფრაქცია, გლუტენის დეგრადაცია შეფასდა რაოდენობრივად და თვისობრივად.
- გლუტენის სრული და სიღრმისეული ჰიდროლიზის დადგენის მიზნით ჩატარდა ელექტროფორეზი (SDS-PAGE).
- განსაზღვრულ იქნა პოლიფენოლური ნაერთების შემცველობა სფექტროფოტომეტრულად, ფოლინ-ჩიკოლტეს მეთოდის საშუალებით
- პრეპარატის ანტიოქსიდანტური აქტივობა FRAP-მეთოდით

➤ საერთო შაქრების რაოდენობა სპექტროფოტომეტრული მეთოდით

V ეტაპზე შემუშავდა იზაბელას ფოთლის პროტეოლიზური ფერმენტის გამოყენებით უგლუტენო პურის მიღების ზოგადი ტექნოლოგიური სქემა.

სამუშაოს აპრობაცია: სადისერტაციო ნაშრომის ძირითადი დებულებები მოხსენებული იყო შემდეგ კონფერენციებზე:

1. საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტის ინფორმატიკისა და მართვის სისტემების ფაკულტეტის მიერ ჩატარებული სამეცნიერო-პრაქტიკულ ონლაინ კონფერენცია- 29 ივნისი 2021 წელი.თეა ნინუა „ საქართველოში მოზარდი ზოგიერთი მცენარიდან პროტეაზული აქტივობის მქონე ცილების შესწავლა და მაღალაქტიური პრეპარატის მიღება”.
2. University of Vienna. The international scientific and technical online conference „Modern Scientific Method“. November 14-15.2024. Tea Ninua, Эдишер Квеситадзе, Тамрико Хобелия, Кристина Муселиани „ПРОТЕАЗА ЛИСТЬЕВ ИЗ АБЕЛЛЫ (VITIS LABRUSCA L.), ЕГО БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ“

სამუშაოს მოცულობა და სტრუქტურა: სადისერტაციო ნაშრომი შედგება შემდეგი ნაწილებისაგან: შესავალი, ლიტერატურის მიმოხილვა, მეთოდოლოგიური კვლევა, შედეგები და მათი განსჯა, დასკვნა და ციტირებული ლიტერატურის ნუსხა. ნაშრომი წარმოდგენილია 119 ფურცელზე. შეიცავს რეზიუმეს, 37 სურათს, 12 ნახაზს, 13 ცხრილს, 4 დიაგრამას, 3 სქემას, დასკვნას და 127 ციტირებულ ლიტერატურას.

სადისერტაციო ნაშრომის შინაარსი

სადისერტაციო ნაშრომის შესავალში წარმოდგენილია სადისერტაციო თემის აქტუალობა, დასახულია მიზანი, რომლის მისაღწევად ჩატარდა სადოქტორო კვლევა. მოკლედია მიმოხილული კვლევის ფარგლებში მიღწეული შედეგები და სამომავლო გეგმები.

ლიტერატურის მიმოხილვა შეეხება: ცელიაკიასა და მის გამომწვევ

მიზეზებსა და გავრცელების სტატისტიკას. ცელიაკიისა და სხვა გლუტენდამოკიდებული დაავადებების მართვის მეთოდებსა და მსოფლიო ბაზარზე უგლუტენო პროდუქციაზე მზარდ მოთხოვნას. გლუტენური ფრაქციის დახასიათებას, მისგან გამოწვეულ პოტენციურ საფრთხეებს, პროტეოლიზური ფერმენტების როლს გლუტენის დაშლისა და უგლუტენო პროდუქციის წარმოების პერსპექტივაში. მეთოდოლოგიური კვლევაში აღწერილია ყველა ის მეთოდი რაც გამოყენებული იქნა კვლევისთვის. აღნიშნული თავი დაყოფილია 4 პირობით ეტაპად. პირველი ეტაპი ეხება მცენარეთა სკრინინგს, მაღალი პროტაზული აქტივობის მქონე ნედლეულის შერჩევას, მასალის შემოწმებას მძიმე მეტალების შემცველობაზე, აგრეთვე საერთო პროტეოლიზური აქტივობის დადგენას.

კვლევის მეორე ეტაპი ეხება პროტეაზას ტექნიკური პრეპარატის მიღებასა და მისი ზოგიერთი ფიზიკურ-ქიმიური პარამეტრის დადგენას (ტემპერატურული და pH- ოპტიმუმი, მოლეკულური მასა) .ამავე ეტაპზე იქნა დადგენილი პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრისა და გელ-დიფუზური მეთოდით იზაბელას პროტეაზას შერჩევითი მოქმედება სხვა პროტეაზებზე და მისი ინჰიბიტორული და აქტივატორული თვისებები.

კვლევის მესამე ეტაპი ეხება ხორბლის ფქვილიდან მიღებულ გლუტენურ ფრაქციაზე იზაბელას ფოთლის პროტეაზას მოქმედებას, გლუტენის დაშლის იდენტიფიცირებას რაოდენობრივი და თვისობრივი მახასიათებლების მიხედვით (ვიზუალურად გლუტენური მასის ზომაში შემცირების შეფასება, სარეაქციო არეში ცილის კონცენტრაციის ცვლილების განსაზღვრა ლოურის მეთოდით, ცილის დაგროვების დინამიკა, ელექტროფორეზი). გლუტენის პროტეოლიზური დაშლის ეტაპზე განსაზღვრულია პრეპარატის ანტიოქსიდანტური თვისებები, საერთო შაქრებისა და საერთო ფენოლების რაოდენობა.

სადისერტაციო ნაშრომში წარმოდგენილია ექსპერიმენტული შედეგები და მათი ანალიზი, რომელთა საფუძველზეც მეოთხე ეტაპზე შემოთავაზებულია უგლუტენო პროდუქციის წარმოების ზოგადი ტექნოლოგიური მიდგომა, რომელიც ასახავს აუცილებელ სამრეწველო ტექნოლოგიურ ეტაპებს . დისერტაციის ბოლოს წარმოდგენილია მიღებული შედეგების განსჯა და გამოყენებული ლიტერატურის ნუსხა.

ექსპერიმენტული კვლევის შედეგები და მათი განსჯა

კვლევის პირველ ეტაპზე ჩატარდა საქართველოში გავრცელებული საკვები და სამკურნალო მცენარეთა სკრინინგი პროტეოლიზური ფერმენტის მაღალი შემცველობის მქონე ნიმუშების გამოვლენის მიზნით. საბოლოოდ, სამუშაო ობიექტად შეირჩა იზაბელას (*Vitis Labrusca* L.) ფოთოლი და მასში არსებული პროტეაზა. (იხ სურათი 1):



სურათი 1. იზაბელა

მასალა შემოწმდა მძიმე მეტალების შემცველობაზე. ამ მიზნით ანალიზი ჩატარდა საქართველოს სხვადასხვა რეგიონიდან ჩამოტანილ იზაბელას ფოთლებსა და შესაბამისი ადგილიდან ნიადაგების ნიმუშებს. უნდა აღინიშნოს, რომ სინჯებს შორის არ შეიმჩნეოდა მეტალების შემცველობებს შორის მკვეთრი სხვაობა, ამიტომ ყველა შედეგი აისახა ერთიან ცხრილებში: (იხ. ცხრილი 1 და 2)

ცხრილი 1. მძიმე მეტალების კონცენტრაცია იზაბელას ფოთლების ნიმუშებში

მეტალი	ზ.დ.კ.მგ/კგ	მიღებული შედეგი მგ/კგ
სპილენძი	3,0	< 0,00188
თუთია	23	< 0,00798
ტყვია	6,0	< 0,00373
კადმიუმი	0,15	---

ცხრილი 2. ზოგიერთი მინერალის შემცველობა იზაბელას ფოთლის ექსტრაქტში

მეტალი	ტალღის სიგრძე ნმ.	შეიცავს/არ შეიცავს
რკინა	248,3	+
კალციუმი	422,7	+
მაგნიუმი	285,2	+
კალიუმი	766,5	+
ნატრიუმი	589,0	+
მანგანუმი	285,3	-
ვერცხლისწყალი	253,7	-
ვერცხლი	328,1	-
ნიკელი	232,0	-
კალა	286,3	-
ქრომი	425,5	-

ნედლეულიდან ფერმენტული ნიმუშების გამოყოფა

ნედლეულად გამოიყენება იზაბელას ფოთლი(ახალმოკრეფილი, ჩრდილში გამშრალი ან გაყინული). ნედლეული იწონება, შემდეგ საგულდაგულოდ ქუცმაცდება ექსტრაქტორში ან ფაიფურის როდინში, ემატება 0,1M კალიუმის ფოსფატის ბუფერი (PBS) pH=7,2. თანაფარდობით 1/10 (მასა/მოცულობა), გრძელდება ჰომოგენიზაცია თითქმის ერთგვაროვანი მასის მიღებამდე. ნარევი იფილტრება და ცენტრიფუგირდება 3000ბრ/წთ 10 წთ. სუპერნატანტი გროვდება პროტეაზული აქტივობის განსაზღვრისათვის.

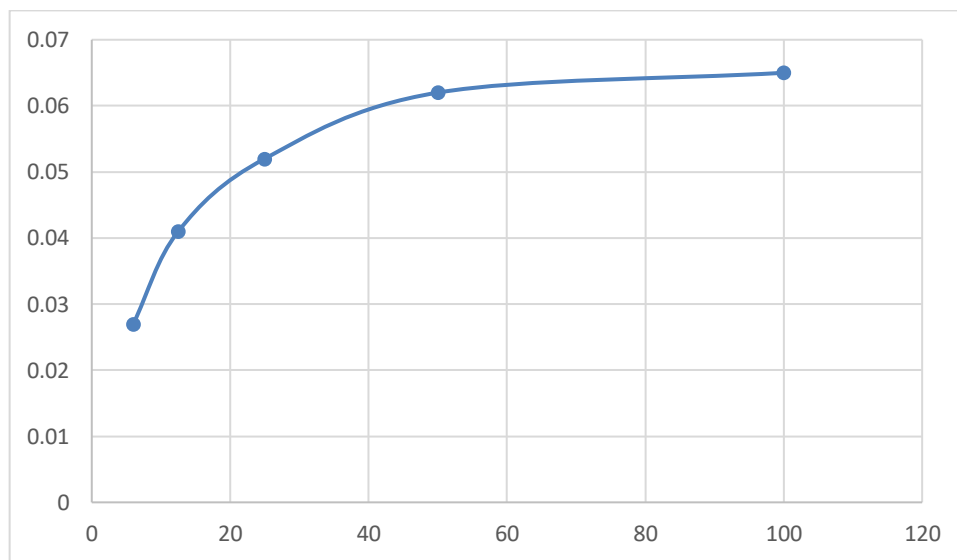
პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრა იზაბელას ფოთლებიდან მიღებულ ექსტრაქტში

პროტეოლიზური აქტივობის შემოწმების მიზნით გამოყენებულ იქნა EWMP- სუბსტრატი, რომელიც გამოირჩევა განსაკუთრებული მდგრადობით- პრაქტიკულად უხსნადი რჩებოდა 30 წთ-ის განმავლობაში, რაც საკმარისია პროტეაზული აქტივობის გაზომვისათვის. მასში ცილის რაოდენობა თირო- ზინზე გადათვლით 30 წთ-ში შეადგენს 0.0057 მიკრომოლს, რაც იმდენად დაბალი მაჩვენებელია, რომ შესაძლოა მივიჩნიოთ ნულოვან წერტილად

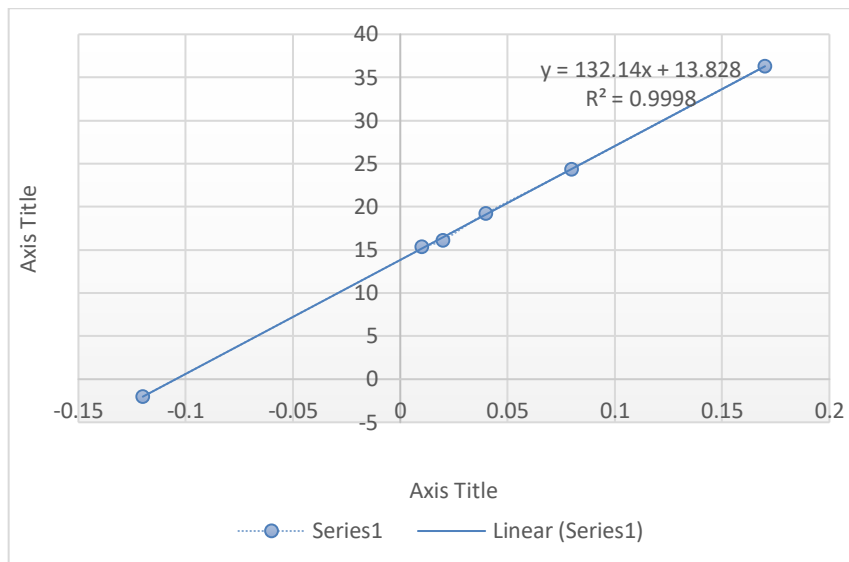
ფერმენტული აქტივობის გაზომვისას ბრედფორდის მეთოდის საშუალებით განისაზღვრა ცილის კონცენტრაცია სპექტრომეტრულად 578 ნმ-ზე. საკვლევ სინჯებში ცილის კონცენტრაცია განისაზღვრა ხარის შრატის ალბუმინის სტანდარტული ხსნარებით (0.03, 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 მგ/მლ) აგებულ საკალიბრო მრუდზე. იზაბელას ფოთლებიდან მიღებულ ექსტრაქტში მოხდა პროტეაზული აქტივობის გაზომვა. შედეგები მოცემულია ცხრილში და წარმოდგენილია გრაფიკულად:

ცხრილი 3. იზაბელას ფოთლის პროტეაზის პარამეტრები

ფერმენტის წყარო	A U/100	ცილა მგ/მლ	U/მლ	Total U/მლ* მოცულობა	U/mg	მგ.ცილა/ჯ ამური ცილა	ჯამური აქტივობა
იზაბელას ფოთლები	0.00285	0.043	0.143	25.65	0.33	77.4	25.65



ნახაზი 1. იზაბელას ფოთლის პროტეაზის ფერმენტული აქტივობა

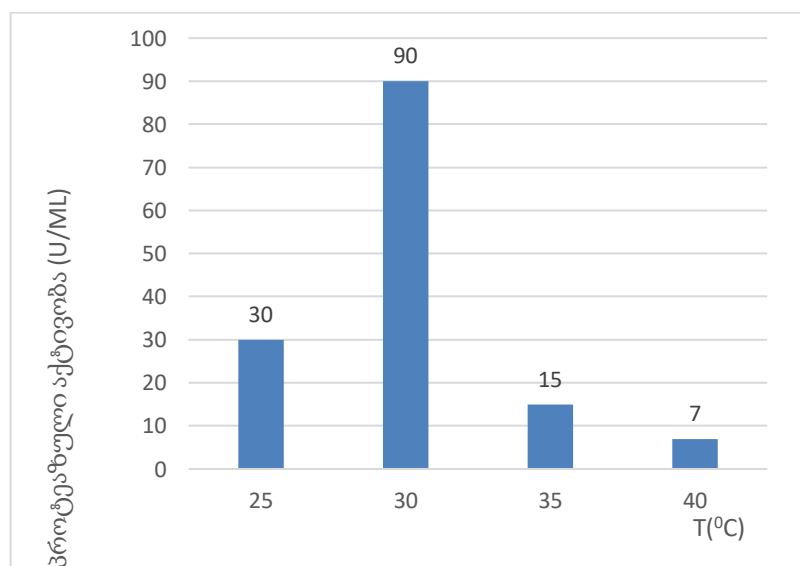


ნახაზი 2. იზაბელას ფოთლის პროტეაზას ფერმენტული აქტივობა-K_m

როგორც ცხრილიდან და გრაფიკებიდან ჩანს, იზაბელას ფოთლის ექსტრაქტში არის მაღალი პროტეოლიზური აქტივობის მქონე ფერმენტი.

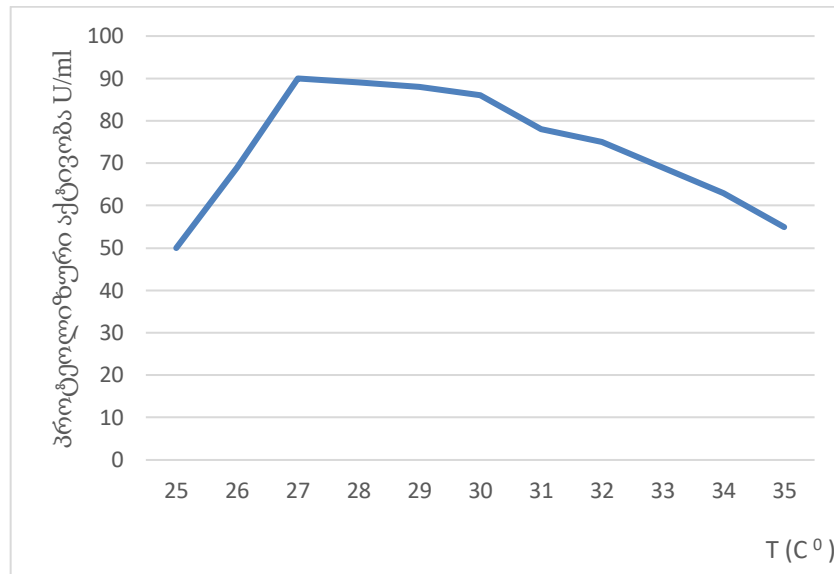
ტემპერატურისა და pH- ოპტიუმის დადგენა იზაბელას ფოთლის პროტეოლიზური ფერმენტისათვის

შესწავლილ იქნა იზაბელას ფერმენტის პროტეოლიზური აქტივობის ცვლილება ტემპერატურულ დიაპაზონში 25°C-40°C-ზე, 5°C-ის ინტერვალით. შედეგები წარმოდგენილია დიაგრამაზე.



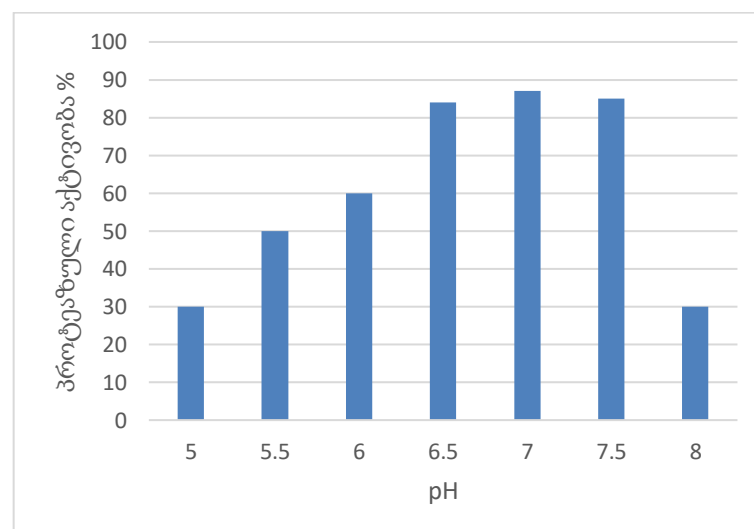
დიაგრამა 1. ტემპერატურის გავლენა იზაბელას ფოთლის პროტეაზას ფერმენტულ აქტივობაზე

25-35° C დიაპაზონში 1° C-იანი ცვლილებებით დადგინდა, რომ ფერმენტი თავის მაქსიმალურ აქტივობას ავლენს 27° C-ზე. (ნახაზი 3).



ნახაზი 3. ტემპერატურის გავლენა იზაბელას ფოთლის პროტეაზას აქტივობაზე

აგრეთვე შესწავლილ იქნა იზაბელას ფოთლის პროტეაზას ფერმენტული აქტივობის ცვლილება pH 5-დან pH 8.0-მდე დიაპაზონში. მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ პროტეაზას მაქსიმალური აქტივობა ვლინდება pH 6.5-7,5 დიაპაზონში, რაც საშუალებას გვაძლევს, რომ იზაბელას პროტეაზა გამოვიყენოთ შედარებით დაბალი pH-ის მქონე გარემოშიც. (დიაგრამა 2).



დიაგრამა 2. pH - ის გავლენა იზაბელას ფოთლის პროტეაზას ფერმენტულ აქტივობაზე

პროტეაზას ტექნიკური პრეპარატის მიღება

პროტეაზას ტექნიკური პრეპარატის მისაღებად გამოვიყენეთ ექსტრაქტი ცილების გამოლექვა $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ის სხვადასხვა პროცენტული გაჯერებით .(იხ.ცხრილი 9). ცხრილში მოცემული მაჩვენებლები ასახავს ამონიუმის სულფატით შესაბამის გაჯერებებს. ტექნიკური პრეპარატის მიღების პროცესში ყველაზე მაღალი პროტეაზული ხვედრითი აქტივობა დაფიქსირდა $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ის 40% გაჯერებისას ($2.01 \pm 0.15 \text{ U/mg}$), თუმცა დიალიზის შემდეგ აქტივობა თითქმის აღარ შეინიშნებოდა. სამაგიეროდ, ფერმენტული აქტივობა ნარჩუნდებოდა ცილის ყინულოვანი ეთანოლით 1:4 თანაფარდობით გამოლექვის შემთხვევაში .

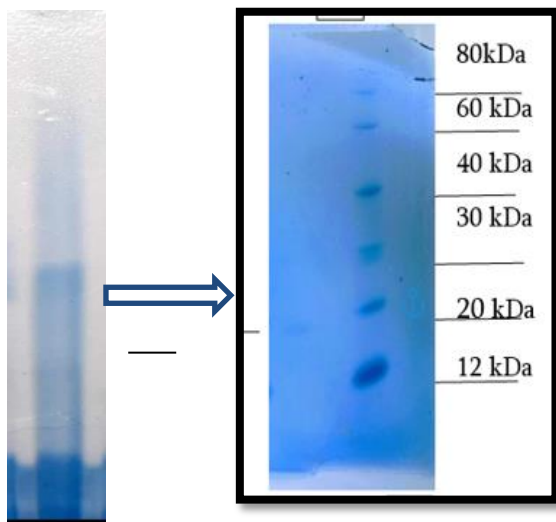
ცხრილი 4. იზაბელას ფოთლის პროტეაზას პრეპარატის მიღების ეტაპები.

(მნიშვნელობები წარმოდგენილია საშუალოს სახით $\pm$ სტანდარტული გადახრა , $p < 0.05$)

გაწმენდის ეტაპები	პროტეაზური აქტივობა (U/ml)	ჯამური პროტეაზური აქტივობა (U)	ცილა (mg/ml)	ხვედრითი აქტივობა (U/mg)
ექსტრაქტი	0.27 ± 0.01	135 ± 7	2.5 ± 0.12	0.67 ± 0.012
ამონიუმის სულფატის ფრაქციები				
20%	0.085 ± 0.0012	4.25 ± 0.18	0.7 ± 0.012	0.06 ± 0.001
40%	1.68 ± 0.10	84 ± 3.01	1 ± 0.1	2.01 ± 0.15
60%	0.97 ± 0.08	48.5 ± 2.5	1.2 ± 0.10	1.9 ± 0.14
80%	0.72 ± 0.001	43.6 ± 0.1	1.6 ± 0.14	0.072 ± 0.0012
სპირტის ფრაქციები თანაფარდობით				
1:4	1.5 ± 0.1	75 ± 3	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.12

ელექტროფორეზი

მიღებული პროტეაზული პრეპარატის სისუფთავე შემოწმდა SDS-PAGE ელექტროფორეზის საშუალებით. ცილის სხვადასხვა მოლეკულური მასის მარკერების გამოყენებით განისაზღვრა მოლეკულური მასა გაწმენდილი ფერმენტის მოლეკულური მასა შეადგენდა -23 kDa.



სურათი 2. იზაბელას ფოთლის პროტეოლიზური ფერმენტის ელექტროფორეზოგრამა

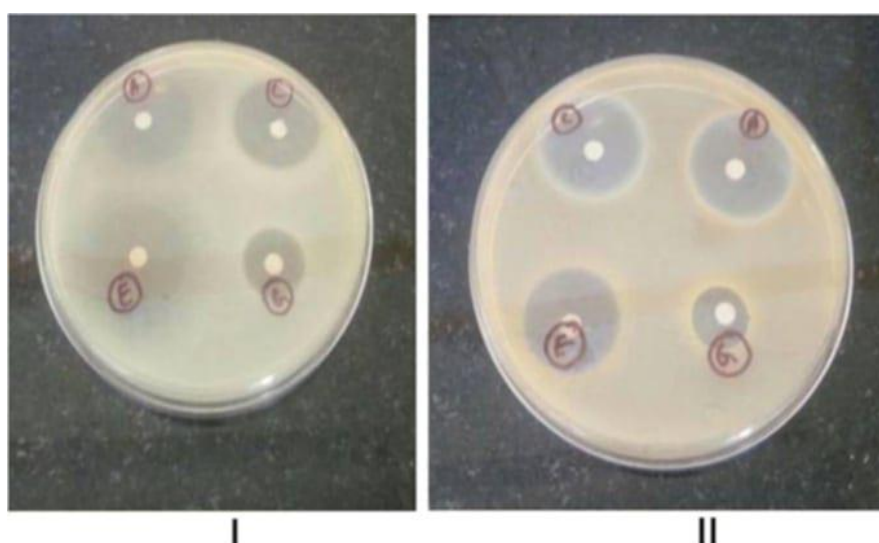
იზაბელას ფოთლის პროტეაზას თვისებების განსაზღვრა გელ-დიფუზური მეთოდით

იზაბელას ფოთლის პროტეაზას თვისებების კვლევის პროცესში ჩვენს მიერ დაფიქსირებულ იქნა საინტერესო ფაქტი- იზაბელას ფოთლის პროტეაზა შერჩევითად მოქმედებდა სხვა ფერმენტებზე და იწვევდა მათი აქტივობის გაძლიერებას ან დათრგუნვას. ეს ფაქტი თავდაპირველად დავაფიქსირეთ EWMP-სუბსტრატის შემცველ არეში ფერმენტების ურთიერთქმედებისას (იხ. ცხრილი 10), ხოლო შემდგომ იდენტიფიცირება მოვახდინეთ გელდიფუზური მეთოდით (იხ.სურ. 15).აღებული იყო მცენარეული პროტეაზები (ძიძო, მინდვრისნემსა), სოკოს პროტეაზა (*penicillium candidum* 5-1-ის მიერ წარმოებული ფერმენტი) და ცხოველური (ქიმოტრიპსინი) .

ცხრილი 5. იზაბელას ფოთლის პროტეაზას გავლენა სხვადასხვა ფერმენტის პროტეაზულ აქტივობაზე

პროტეაზას წყარო	protein mg/ml დამუშავებამდე	U/mg	protein mg/ml დამუშავების შემდეგ
ძიძო	0.0064	40,63	0,005
მინდვრისნემსა	0.043	40.47	0,031
<i>penicillium candidum 5-1-</i>	2,5	55,5	3,7
თხაწართხალა	0.077	14.84	0,06
ქიმოტრიპსინი	1,2	62,2	1,5

ცხრილიდან თვალნათლივ ჩანს, რომ აღნიშნულ ფერმენტებს აქვთ საკმაოდ მაღალი პროტეაზული აქტივობა. სხვა ფერმენტებზე იზაბელას ფოთ-
ლიდან გამოყოფილი ფერმენტის ზეგავლენის ვიზუალიზაციისათვის გამო-
ვიყენეთ გელ-დიფუზიური მეთოდი (იხ. სურათი 3). სუბსტრატად გამოყენებულ
იქნა კაზეინი, ჩაპოლიმერიზებული აგარში. (A-ძიძოს პროტეაზა,
C-მინდვრისნემსას პროტეაზა, E- სოკოს პროტეაზა, G-ცხოველური პროტეაზა.
I - ცალკეული ფერმენტის ფერმენტული აქტივობა; II- ფერმენტული აქტივობა
იზაბელას ფოთლის პროტეაზათი დამუშავების შემდეგ.)



სურათი 3. გელ-დიფუზიური მეთოდით პროტეაზული აქტივობის განსაზღვრა

როგორც სურათიდან ჩანს, კონტროლთან შედარებით რგოლების დიამეტრი შემცირებულია A და C რგოლებში, ხოლო მომატებულია E და G- რგოლებში, რაც მოწმობს პირველ შემთხვევაში ფერმენტული აქტივობის დაქვეითებაზე, ხოლო მეორე შემთხვევაში კი -მატებაზე.

იზაბელას ფოთლის პროტეოლიზური ფერმენტის მოქმედება გლუტენზე

სადისერტაციო კვლევის დასკვნით ეტაპზე ჩატარებულ იქნა კვლევა ხორბლის ფქვილის გლუტენური ფრაქციის დაშლის შესაძლებლობა იზაბელას პროტეოლიზური ფერმენტის გამოყენებით.

გლუტენის მისაღებად მზადდებოდა ელასტიური ცომი ფქვილითა და წყლით. ფქვილში არსებული სახამებლის, ხსნადი ცილებისა და სხვა თანმდევი ნივთიერებების მოცილების მიზნით ცომი ირეცხებოდა გამდინარე წყალში, კიდრე წყლის ფერი გახდებოდა გამჭვირვალე. ასეთი ხერხით მიღებულ გლუტენს ემატებოდა ფერმენტული ხსნარი თანაფარდობით 1/10 (მასა/მოცულობა) და ხდებოდა ინკუბაცია. სარეაქციო არეში იზაბელას ფერმენტის კონცენტრაცია 1 გ. გლუტენზე გადაანგარიშებით შეადგენდა 1.43 U/მლ. პროტეაზას გავლენით გლუტენი, როგორც ცომის უხსნადი ცილოვანი ნივთიერება, სწრაფად და ეფექტურად იშლება ხსნად პეპტიდურ ფრაგმენტებად. ცილის დაგროვების სიჩქარე რეაქციის არეში განისაზღვრა ლოურის მეთოდით.



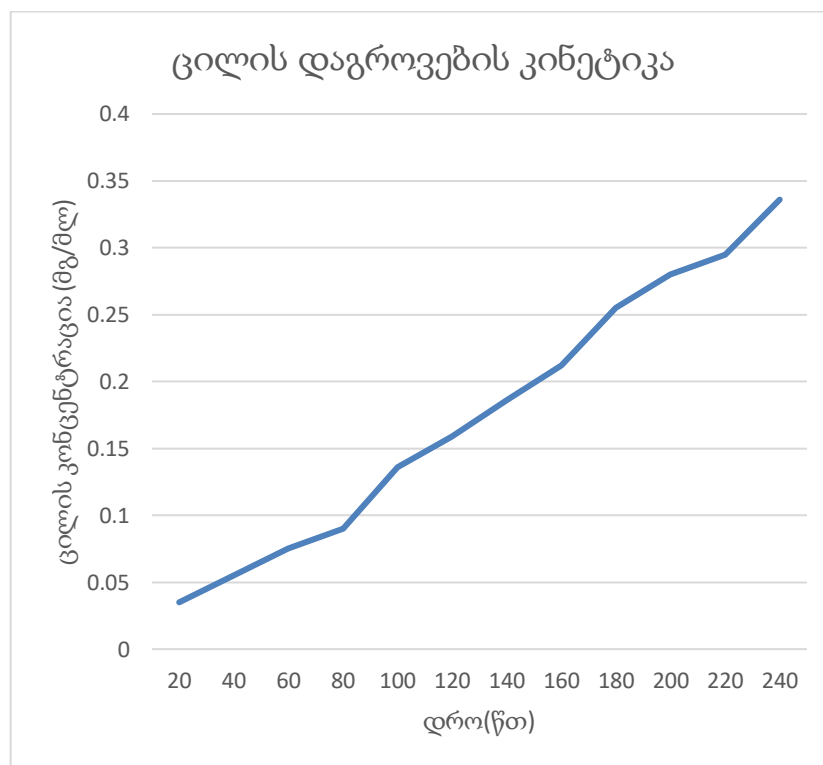
სურათი 4. იზაბელას ფოთლის პროტეაზას ტექნიკური პრეპარატის მოქმედება გლუტენზე

ცხრილი 6. სარეაქციო არეში ცილის დაგროვების ხარისხი გლუტენის იზაბელას ფოთლის პროტეაზით დამუშავებამდე და დამუშავების შემდეგ

პარამეტრი	მაჩვენებელი (მგ/მლ)
ცილის კონცენტრაცია სარეაქციო არეში ჰიროლიზამდე	19,420
ცილის კონცენტრაცია სარეაქციო არეში ჰიდროლიზის შემდეგ	31,0611

სარეაქციო არეში ცილის დაგროვების კინეტიკა დროში ასახულია ნახაზზე 4.

ცილის კონცენტრაციის გამოსათვლელად ვიყენებდით შესაბამის საკალიბრო მრუდს.



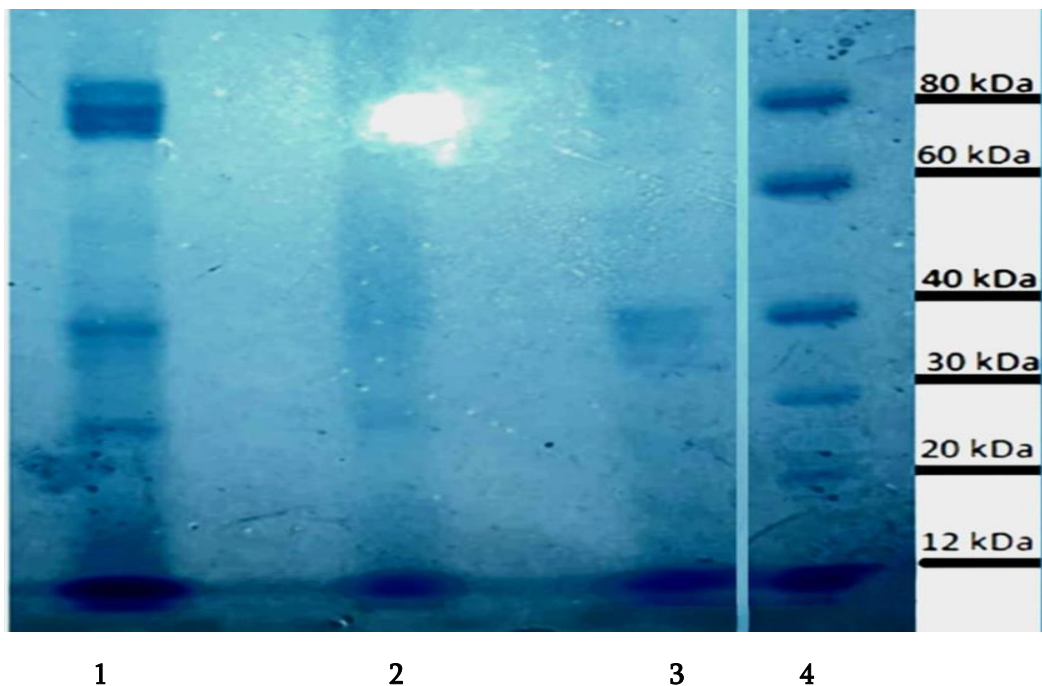
ნახაზი 4 . ცილის რაოდენობის ცვლილება დროში სარეაქციო არეში

სარეაქციო არეში ცილის კონცენტრაციის ნაზრდი ($\Delta C \approx 11.64$ მგ/მლ) მეტყველებს ,რომ იზაბელას პროტეაზას ჰიდროლიზური ზემოქმედების შედეგად გლუტენური ფრაქციის უხსნადი ცილების გარდაქმნაზე ხსნად კომპონენტებად .

გლუტენის პროტეოლიზური დაშლის იდენტიფიცირება

ელექტროფორეზის გზით

გლუტენის სიდრმისეული დაშლა იზაბელას ფოთლის პროტეაზას მიერ დადასტურებულ იქნა დისკ-ელექტროფორეზით 12% პოლიაკრილამიდის გელში (SDS-PAGE). ნიმუშებად აღებული იყო როგორც გლუტენი და იზაბელას ფერმენტი, ასევე გლუტენის ჰიდროლიზატი იზაბელას პროტეაზათი დამუშავების შემდეგ. ელექტროფორეზგამაზე ნათლად ჩანს გლუტენური ფრაქციისა (ბილიკი 1) და იზაბელას პროტეოლიზური ფერმენტის (ბილიკი 3) ანაბეჭდები, ხოლო მათ შორის - გლუტენის ჰიდროლიზებული ნაწილების ანაბეჭდები. იზაბელას პროტეოლიზური ფერმენტი თავისი სპეციფიკით ახდენს წებოგვარას ყველა ფრაქციის ღრმა ჰიდროლიზს და მიჰყავს საბოლოო პროდუქტებამდე - დაბალმოლეკულურ პეპტიდებამდე და ამინომჟავებამდე, რაზეც მიუთითებს ჰიდროლიზატის ბილიკებზე გლუტენის ფრაგმენტების გაქრობა (ბილიკი 2). პროტეოლიზური ეფექტის ვიზუალიზებისათვის გამოყენებულია ცილოვანი მოლეკულური მასის მარკერები. (ბილიკი 4).



სურათი 5 . იზაბელას ფოთლის ფერმენტით გლუტენის პროტეოლიზი დენატურირებადი პოლიაკრილამიდის გელში (SDS-PAGE)

ბილიკი 1 - გლუტენის ელექტროფორეზი დენატურულ პირობებში; ბილიკი 2 - გლუტენის იზაბელას პროტეაზათი გლუტენის დამუშავების შედეგი; ბილიკი 3 - იზაბელას ფერმენტშემცველი ექსტრაქტის ელექტროფორეზი დენატურულ პირობებში; ბილიკი 4 -

მოლეკულური მასის მარკერები.

ბილიკების ფუძეში არსებული ზოლები მეტყველებს ამინომჟავების თანაობაზე. აღნიშნული ფაქტები საშუალებას გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ შესაძლებელია უგლუტენო პურის პროდუქტების წარმოების ტექნოლოგიის შემუშავება.

იზაბელას ფოთლის პროტეაზას გამოყენებით უგლუტენო პურის დამზადება

მსოფლიო ბაზარზე დიდი მოთხოვნაა ისეთ უგლუტენო პურზე, რომელსაც ხორბლის ფქვილისგან დამზადებული პურის გემოვნური თვისებები ექნება. ეს არის გზა, რომელსაც ჩვენ ვთავაზობთ, რომელიც საშუალებას გვაძლევს განვავითაროთ უგლუტენო პურის წარმოების ტექნოლოგია იზაბელას (*Vitis. Labrusca L.*) ფოთლის პროტეაზების გამოყენებით.

შედარების მიზნით გამოვაცხვეთ ორი სახის პური- როგორც ჩვეულებრივი, ასევე უგლუტენო. ჩვეულებრივი პურის ცომთან შედარებით, უგლუტენო პურის ცომი იყო უფრო თხევადი კონსისტენციის, ნაკლებ წებოვანი.



სურათი 6. ჩვეულებრივი ცომი ხორბლის ფქვილისაგან



სურათი 7. უგლუტენო ცომი,მიღებული იზაბელას ფოთლის პროტეაზას დამატებით

გამომცხვარი პროდუქტი გამოირჩეოდა მეტი ფხვიერებით,ადვილად იფშვნებოდა. რაც შეეხება საგემოვნო თვისებებს, ახლადგამომცხვარ უგლუტენო პურს ჰქონდა სასიამოვნო არომატი, ოდნავ მოტკბო გემო,ფერი კი -ოდნავ მუქი,რადგან იზაბელას ფერმენტის პრეპარატს თან მიჰყვება მცენარეული პიგმენტების კვალი.



I

II

სურათი 9. ჩვეულებრივი პური (I) და უგლუტენო პური,მიღებული იზაბელას ფოთლის პროტეოლიზური ფერმენტის დამატებით (II)

მიღებული პროდუქტის დახასიათება მოხდა ფერით, გემოთი, არომატით, სუნით და ტექსტურით, და უგლუტენო ხორბლის პური შეფასდა შემდეგნაირად : გემო - ოდნავ ტკბილი, სუნი - ხორბლის პურის დამახასიათებელი, არომატი -

ხორბლის პურის დამახასიათებელი მცენარეული არომატების ნოტებით , ტექსტურა - ოდნავ ნოტიო, ფერი - ხორბლის პურთან შედარებით რუხი.

ჯამური ფენოლებისა და შაქრების რაოდენობის განსაზღვრა იზაბელას ფოთლის პროტეაზას გამოყენებით მიღებულ უგლუტენო ცომში

იზაბელას ფოთლიდან მიღებული ექსტრაქტები ხასიათდება ფენოლური ნაერთების შემცველობით. როდესაც ვახდენდით ცომის დამუშავებას პროტეაზებით გლუტენის დაშლის მიზნით, იზაბელას ექსტრაქტის შემთხვევაში ჩვენი ყურადღება მიიპყრო სასიამოვნო არომატის გაჩენამ. შემდგომმა გაზომვებმა დაადასტურა, რომ ადგილი ჰქონდა ფენოლური ნაერთების კონცენტრაციის მატებას.

რაც შეეხება შაქრების რაოდენობის ცვლილებას, სავარაუდოდ, ამით უნდა აიხსნებოდეს უგლუტენო პურპროდუქტის მოტკბო გემო ჩვეულებრივ პურთან შედარებით (თუმცა ამ ეტაპზე ჩვენ მხოლოდ ფაქტის დადასტურებით შემოვიფარგლებით, რადგან არ ჩავგიტარებია სიღრმისეული კვლევა). ცხრილში წარმოდგენილია ჩვენს მიერ ჩატარებული გაზომვების შედეგები:

ცხრილი 7. კლასიკური ცომის და ხორბლის უგლუტენო ცომის ბიოქიმიური პარამეტრები

პარამეტრი ცომი	საერთო შაქრები მგ/მლ	გლუკოზა მგ/მლ	საერთო ფენოლები მგ/მლ
ჩვეულებრივი ცომი	1,418	0,177	0.14
უგლუტენო ცომი	1,607	0,948	0,7

საქართველოში გავრცელებული ზოგიერთი ენდემური ჯიშის ვაზის ფოთლების პროტეაზური და გლუტენაზური აქტივობის სკრინინგი

იზაბელას პროტეაზას ზემოქმედებით გლუტენის დაშლის შესწავლამ დაბადა ლოგიკური კითხვა: ვაზის სხვა ჯიშებშიც ხომ არ არის მსგავსი მოქმედების პროტეაზები? ამ მიზნით ჩატარდა სკრინინგი. უპირატესობა მივანიჭეთ ქართული ვაზის იმ ენდემურ ჯიშებს, რომლებიც გამოირჩეოდნენ

თავიანთი მდგრადობით პათოგენური მიკროორგანიზმებისა და მავნე მწერების მიმართ. მასალა აღებულ იქნა საქართველოს სხვადასხვა რეგიონში .

განისაზღვრა როგორც პროტეაზული აქტივობა, ასევე მათი უნარი, ზეგავლენა მოეხდინათ გლუტენის დაშლაზე. ცხრილში წარმოდგენილია ჩვენს მიერ ჩატარებული სამუშაოს შედეგები:

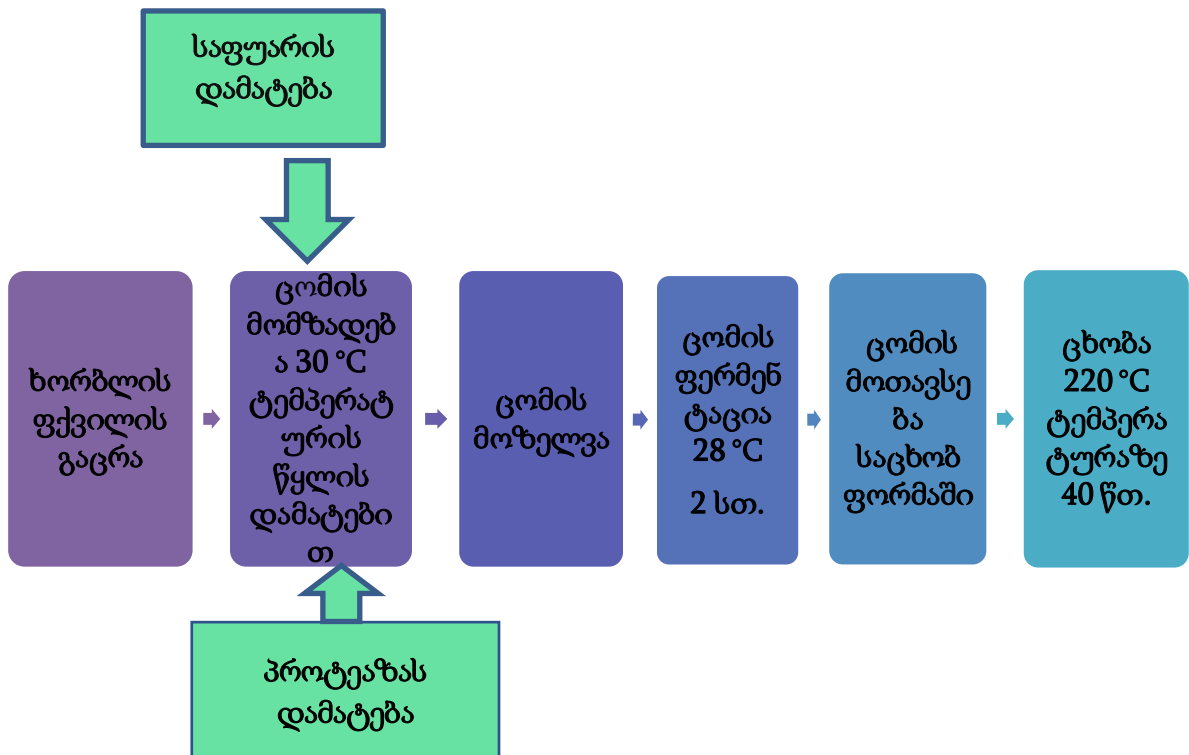
ცხრილი 8. ქართული ვაზის ზოგიერთი ჯიშის ფოთლებში პროტეაზული და გლუტენაზული აქტივობის დადგენა

ვაზის ჯიში	ცილა მგ/მლ	პროტეაზული აქტივობა U/მლ	ცილა ჰიდრო-ლიზამ-დე მგ/მლ	ცილა ჰიდრო-ლიზის შემდეგ მგ/მლ	ΔC მგ/მლ
თავკვერი	0,32	0,01	17,61	20,1	2,49
ცოლიკოური	0,35	0,014	20,07	24,15	4,08
რქაწითელი	0,31	0,016	16,15	17,8	1,65
ხიხვი	0,37	0,013	18,21	19,76	1,55
მესხური შავი	0,37	0,016	29,31	33,7	3,39
ცხენისძუძუ თეთრი	0,39	0,016	26,65	28,06	1,41
მეკრენჩხი	0,35	0,023	25,1	30,7	5,6
ჭვიტოლური	0,37	0,018	31,48	34,39	2,91
ჩინური	0,36	0,014	19,49	21,91	2,42
კლარჯულა	0,38	0,021	25,28	28,91	3,63

როგორც ცხრილიდან ჩანს, ცილების შემცველობა ყველა აღებულ ობიექტში თითქმის ერთნაირია, ოდნავ მაღალი პროტეაზული აქტივობით გამოირჩევიან კლარჯულა და მეკრენჩხი, რაც შესაბამისად აისახა კიდევ მათ მიერ გლუტენის ჰიდროლიზის თვალსაზრისით.

იზაბელას ფოთლის პროტეაზას საშუალებით პურის დამზადების ზოგადი ტექნოლოგიური სქემა

ჩვენს მიერ წარმოდგენილ სამუშაოში აქცენტი გაკეთებულია ახალი თვისებების მქონე პროტეაზის არსებობის დასაბუთებაზე. ვინაიდან ეს არის არსებული ფერმენტის შესწავლის პირველი ნაბიჯი, ამ ეტაპზე არ ჩავთვალეთ მიზანშეწონილად ტექნოლოგიური სქემის დეტალური ვერსიის წარმოდგენა. ჩვენს მიერ შემოთავაზებულია ზოგადი ტექნოლოგიური მიდგომა, რომელიც ასახავს აუცილებელ სამრეწველო ტექნოლოგიურ ეტაპებს და არ გამოხატავს საბოლოო სამრეწველო ტექნოლოგიას.



სქემა 3 . უგლუტენო პურის მიღების ბლოკ-სქემა

დასკვნა

1. სადოქტორო კვლევის ფარგლებში პირველად იქნა იდენტიფიცირებული იზაბელას (*Vitis Labrusca* L.) ფოთლებში პროტეოლიზური აქტივობის მქონე ცილა
2. დადგენილ იქნა იზაბელას (*Vitis Labrusca* L.) ფოთლებში მძიმე მეტალების შემცველობა
3. დადგენილ იქნა იზაბელას (*Vitis Labrusca* L.) ფოთლებში არსებული პროტეოლიზური ფერმენტის აქტივობის ხარისხი კაზეინისა და EWMP-ის მიმართ
4. შესწავლილ იქნა იზაბელას ფოთლის პროტეოლიზური ფერმენტის ზოგიერთი მახასიათებელი, როგორცაა ტემპერატურისა და pH- ოპტიმუმი
5. გელ-დიფუზური მეთოდით დადგენილ იქნა იზაბელას ფოთლის პროტეოლიზური ფერმენტის ინჰიბიტორული გავლენა მცენარეულ პროტეაზებზე და გამააქტივებელი გავლენა მიკრობულ პროტეაზებზე
6. მიღებულ იქნა იზაბელას ფოთლის პროტეაზას ტექნიკური პრეპარატი
7. სადოქტორო კვლევის ფარგლებში პირველად იქნა იდენტიფიცირებული იზაბელას (*Vitis Labrusca* L.) ფოთლის პროტეაზას ზემოქმედება ხორბლის გლუტენური ფრაქციის უხსნად ცილებზე
8. იზაბელას ფოთლის პროტეაზას მიერ გლუტენური ცილების სიღრმისეული დაშლა დადასტურებულ იქნა რაოდენობრივი და თვისობრივი პარამეტრების მიხედვით. ელექტროფორეზის მეშვეობით იდენტიფიცირდა წებოგვარას ცილების დაშლა ხსნად დაბალმოლეკულურ ფრაგმენტებამდე.
9. იზაბელას ფოთლის პროტეოლიზური ფერმენტით გლუტენის დაშლის შედეგად მიღებულ იქნა ხორბლის ფქვილის უგლუტენო ცომი, რომელშიც განისაზღვრა ცილების, ფენოლებისა და შაქრების ჯამური შემცველობა .
10. დადგენილ იქნა 1გ. გლუტენზე იზაბელას ფოთლის პროტეაზას გამოყენების ოპტიმალური დოზა(1,43 U/მლ) და ინკუბაციის დრო- 2 სთ.
11. ჩამოყალიბდა ხორბლის უგლუტენო პურის ზოგადი ტექნოლოგიური სქემა.
12. დაისახა იზაბელას ფოთლის პროტეაზას გამოყენების პერსპექტივა უგლუტენო პროდუქციის წარმოებაში, რომელსაც შენარჩუნებული ექნება ტრადიციული პროდუქტის საგემოვნო თვისებები და ხელმისაწვდომი იქნება ცელიაკით

სადისერტაციო ნაშრომების ძირითადი შედეგები წარმოდგენილია
შემდეგ პუბლიკაციებში:

1. Ninua T. buachidze T. Khokhonishvili S. (2021). Mineral qualities of Isabella grapevine (*Vitis labrusca* L.) leaf. *Annals of Agrarian Science*. vol.19 No.3. p.220-222. <https://journals.org.ge/index.php/aans/issue/view/26/31>
2. Ninua T. Khobelia T. Museliani K. Kvesitadze E. Buachidze T. (2022). Study of proteins with protease activity from some plants growing in Georgia and preparation of highly active preparation. *Annals of Agrarian Science*. vol.20 No.4. p.213-215. <https://journals.org.ge/index.php/aans/issue/view/38/44>
3. Khobelia Tamriko, Museliani Kristine, Ninua Tea, Kvesitadze Edisher. (2022.) -Colorimetric As-say To Determine Total Proteolytic Activity. *BULLETIN OF THE GEORGIAN NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*. Vol.16 no.2. p.106-113
4. Ninua Tea (2024). Degradation of gluten using plant proteases. *International Journal of Science and Research Archive*. 13(02), p. 394–400. Article DOI: <https://doi.org/10.30574/ijrsra.2024.13.2.2107>
5. საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტის ინფორმატიკისა და მართვის სისტემების ფაკულტეტი. სამეცნიერო-პრაქტიკულ ონლაინ კონფერენცია- 29 ივნისი, 2021 წელი
6. University of Vienna. The international scientific and technical online conference „Modern Scientific Method“. November 14-15.2024. Tea Ninua, Edisher Kvesitadze, Tamriko Khobelia, Kristina Museliani „ПРОТЕАЗА ЛИСТЬЕВ ИЗABELЛЫ (*VITIS LABRUSCA* L.), ЕГО БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ“

Abstract intervali 1

The doctoral thesis refers to the discovery of a proteolytic enzyme in the leaves of the natural hybrid variety of grape - Isabella (*Vitis Labrusca* L.), the study of some of its physico-chemical properties, and the prospect of its practical use for breaking down wheat gluten.

Celiac disease is a chronic multifactorial inflammatory disease characterized by intestinal and non-intestinal manifestations - production of specific blood serum antibodies and autoimmune response, lesions of the small intestine mucosa, and others. Celiac disease is considered a systemic disorder and is associated with the intake of gluten, which is contained in bread and bakery products, pasta and confectionery, beer, cereals. The disease mostly occurs in people who are genetically sensitive to gluten. Human digestive tract enzymes cannot completely destroy gluten fraction proteins. As a result of improper fermentation, the so-called Gluten peptides, which comprise 10% of dietary gluten, initiate intestine and immune reactions. This type of activation is not observed in healthy people - insoluble peptide fragments are excreted together with, for example, urine. Thus, pathogenic action can be avoided if we break down gluten into amino acid components.

It is known that with the help of proteolytic enzymes, it is possible to break down various protein substrates into small peptides and amino acids, which is of great importance in various biotechnological processes. It is especially important to find proteases that break down the gluten fraction of wheat into small peptide fragments and amino acids, while maintaining or improving the taste properties of the food product. The fact that the source of proteases is cheap, widely available and safe raw materials, such as edible and medicinal plants, is gaining relevance.

Within the framework of the doctoral work, a number of medicinal and edible plants distributed in Georgia were screened in order to detect proteins with protease activity in them. Raw materials with high proteolytic activity were selected, some of their physical and chemical characteristics were determined (mineral composition, heavy metal content, degree of proteolytic activity, temperature and Ph-optimum, etc.) Finally, the appropriate raw material was selected - Isabella (*Vitis Labrusca* L.), which is a

hybrid cultivated plant and stands out for its resistance to various diseases or agricultural pests, the fruit is characterized by good taste, although the leaf has not yet been widely used.

During the study of the biological properties of Isabella leaves, the presence of proteolytic enzyme was determined. It should be noted that the vine leaves are a waste product of the agricultural industry, which is collected in large quantities and so far it is not possible to fully utilize them. Considering the cheapness of the raw materials, the task was set to use the biological properties of these leaves in various fields. One such direction has been the breakdown of gluten in the production of bakery products to avoid the effects of diseases such as celiac disease.

In the next stage of the doctoral research, the gluten protein complex was obtained from the dough made with wheat flour, the gluten in traditional dough was enzymatically decomposed using Isabella's proteolytic enzyme and the proteolytic effect was evaluated according to the change in protein concentration in the reaction zone, since peptides and amino acids formed as a result of gluten decomposition would accumulate in the reaction zone under the influence of protease.

SDS electrophoresis –carried out after fermentation .

Recommendations on the prospect of using Isabella's proteolytic enzyme for the production of gluten-free products were developed.